

⑯ 日本国特許庁 (JP)  
⑰ 公開特許公報 (A)

⑪ 特許出願公開  
昭58-210000

⑯ Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 12 Q 1/60  
G 01 N 27/26  
33/92

識別記号  
8213-4B  
7363-2G  
8305-2G

⑯ 公開 昭和58年(1983)12月7日  
発明の数 1  
審査請求 未請求

(全3頁)

⑯ リポ蛋白質コレステロール濃度の測定方法

号日本ケミファ西ヶ原寮内

⑯ 特 願 昭57-92731

⑯ 出願人 日本ケミファ株式会社

⑯ 出願 昭57(1982)5月31日

東京都千代田区岩本町2丁目2番3号

⑯ 発明者 浦田武義

⑯ 代理人 弁理士 有賀三幸

外2名

東京都北区西ヶ原2丁目29番3

明細書

1. 発明の名称

リポ蛋白質コレステロール濃度の測定方法

2. 特許請求の範囲

検体を電気泳動に付してリポ蛋白質コレステロールを分画した後、該リポ蛋白質コレステロールにコレステロールエステラーゼ、好気性微生物由来のNAD依存性コレステロールデヒドロゲナーゼ、NAD、ジアフォラーゼ及びNTBを含有する染色試薬を作用させて発色せしめることを特徴とするリポ蛋白質コレステロール濃度の測定方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明はリポ蛋白質コレステロール濃度の測定方法に関する。

一般に、血清中のリポ蛋白質コレステロール、既中高比重リポ蛋白質コレステロール(HDL-C)濃度の測定は、冠状動脈症等の疾患の成因や診断の場に於て有用である。

而して、従来よりリポ蛋白質コレステロール濃度の測定法としては種々の方法が報告せられて

るが、それぞれに難点があり、臨床上未だ充分満足し得るものはなかつた。

そこで、本発明者は斯かる従来の難点を解消し、信頼性の高い、臨床上有効な測定方法を提供すべく種々研究を重ねた結果、染色反応が速く、シャープで鮮明なパターンが得られる新規な染色試薬を開発し、本発明を完成したものである。

すなわち、本発明は検体を電気泳動に付してリポ蛋白質コレステロールを分画した後、該リポ蛋白質コレステロールにコレステロールエステラーゼ(以下C-Eと略称す)、好気性微生物由来のNAD依存性コレステロールデヒドロゲナーゼ(以下C-DHと略称す)、NAD、ジアフォラーゼ(以下D-Iと略称す)及びNTBを含有する染色試薬を作用させて発色せしめることを特徴とするリポ蛋白質コレステロール濃度の測定方法である。

本発明を実施するには、まず血清等の体液を検体として電気泳動に付してリポ蛋白質コレステロールを分画する。而してここに電気泳動はリポ蛋白

白質コレステロールを分画し得るものであれば、その具体的泳動法の如何を問わないが、例えば泳動用支持体としては薄層アガロースフィルムが、支持体緩衝液としてはバルビタール緩衝液が、泳動用緩衝液としてはトリシン- $\text{Li}^+$ 緩衝液が好適であり、泳動条件としてはアガロースフィルム-コーニングシステムで90V、60~70分間泳動で目的を達することができる。

次に、該電気泳動により分離せられたリポ蛋白質コレステロール、すなわち高比重リポ蛋白質コレステロール(HDL-C)、超低比重リポ蛋白質コレステロール(VLDL-C)、低比重リポ蛋白質コレステロール(LDL-C)に、CE、CDH、NAD、DI及びNTBを含有する染色試薬を作成させる。

ここに染色試薬は、例えば0.1MトリシンNa(pH 7.6~9.6)3ml中、CE 10~15u、CDH 6~15u、DI 10~15u、NAD 10~15mM、NTB 0.5~1mMを配合することによつて調製される。

により、HDL-C、VLDL-C、LDL-Cの各分画を測定する。そして、常法により求めた總コレステロールに各を乗じてHDL-C、VLDL-C及びLDL-Cの濃度を測定する。

以上の如く本発明は構成されるので、本発明方法を用いれば、迅速な染色反応により、シャープかつ鮮明なパターンを得ることができ、極めて正確なりポ蛋白質コレステロール濃度の測定を行えるものである。しかも本発明によるときは非特異反応も全く認められず、臨床上極めて有利な測定法である。

以下実施例を挙げて本発明を更に説明する。

#### 実施例

##### (1) 電気泳動条件

泳動用支持体：薄層アガロースフィルム  
支持体緩衝液：60mMバルビタール緩衝液  
泳動用緩衝液：50mMトリシン- $\text{Li}^+$ 緩衝液(pH 8.6)

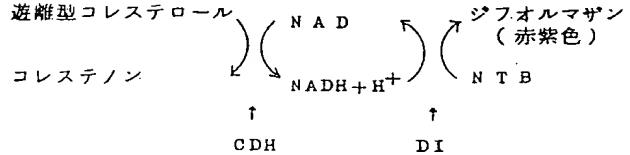
泳動条件：アガロースフィルム-コーニングシステム、90V、70分間泳動

尚、本発明に用いられるCDHは、前述の如く好気性微生物由来のNAD依存性のものであることが必須であるが、斯かるCDHとしては天野製薬株式会社より提供されているものが好適である。

而して、斯かる染色試薬をリポ蛋白質コレステロールに作用させる方法としては所謂脱脂法、サンドイッチ法の何れをも採用し得るものであつて、通常35~38°Cで20~40分間程度インキュベーションすることによつてリポ蛋白質コレステロールを発色せしめることができるものである。

この発色原理は次式の通りである。

エステル型コレステロール  $\xrightarrow{\text{CE}}$  遊離型コレステロール



次いで、斯かる発色反応を発色反応停止液(10%酢酸)を用いて停止せしめた後、精製水にて洗浄後乾燥し、濃度計(densitometer)等

#### (2) 試薬の調製

##### ①染色試薬組成

0.1MトリシンNa(pH 8.6)	3ml
CE	10u
CDH	6u
DI	10u
NAD	10mM
NTB	0.73mM

##### ②染色反応停止液：10%酢酸

##### ③洗浄液：精製水

#### (3) 測定例

試料として血清3μlを上記電気泳動条件により電気泳動後、アガロースフィルムをセルから除去し、上記組成染色試薬3mlをゲル表面に均一に広げ、37°Cで30分間反応させたところ、シャープな赤紫色のコレステロール分画が得られた。

反応後10%酢酸に約1時間、次いで精製水に約1時間浸した後1.0g/μlグリセロールを含む3%酢酸中に約2分間浸した。

然る後、70°Cで20分間ドライヤーにて乾燥

後、分画リボタンパク中のコレステロール分画を570 nmにてデンシトメトリー(densitometry)し、HDL-C、VLDL-C、LDL-C各々35%、5%、60%を得た。そして、常法によつて得た総コレステロール値195 mg/dLを乗じ、HDL-C: 68 mg/dL、VLDL-C: 10 mg/dL、LDL-C: 117 mg/dLを得た。

(4) 非特異反応

染色試薬からCDHだけ抜いた血清プランク用試液を作り、アガロースフィルムにて泳動した血清分画上及びアガロースフィルム全面に対する非特異反応を検討したところ何ら非特異反応を認めなかつた。

以 上

出願人 日本ケミファ株式会社

代理人 弁理士 有賀 三幸

弁理士 高野 登志雄

弁理士 小野 信夫